ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1972 N° 36

ETUDE DE LA TECHNIQUE DE LA CULTURE MIXTE DE LEUCOCYTES CHEZ LE PORC

APPLICATION A L'ETUDE DU SYSTEME D'HISTOCOMPATIBILITE SL_A DU PORC

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

FILLEUL (Xavier, Jean-Marie, Pierre)
Né le 30 AOUT 1942, à Saint Sulpice/Rille (ORNE)

Jury :

Président : M RUFFIE Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Assesseurs M. LAUTIE Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse
M. SAURAT Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse

Impression : BUREAU ANNIE
2, rue des Salenques
TOULOUSE
Tél : 21.86.67

ooo

ETUDE DE LA TECHNIQUE DE LA CULTURE MIXTE DE LEUCOCYTES CHEZ LE PORC

APPLICATION A L'ETUDE DU SYSTEME D'HISTOCOMPATIBILITE SL_A DU PORC

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE
ANNÉE 1972 N° 36

ETUDE DE LA TECHNIQUE DE LA CULTURE MIXTE DE LEUCOCYTES CHEZ LE PORC

APPLICATION A L'ETUDE DU SYSTEME D'HISTOCOMPATIBILITE SL_A DU PORC

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1972

DEVANT

L'UNIVERSITÉ PAUL-SABATIER DE TOULOUSE

PAR

FILLEUL (Xavier, Jean-Marie, Pierre)

Né le 30 AOUT 1942, à Saint Sulpice/Rille (ORNE)

Jury :

Président : M RUFFIE Professeur à l'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Assesseurs M. LAUTIE Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse
M. SAURAT Professeur à l'Ecole Nat. Vétérinaire de Toulouse

Impression : BUREAU ANNIE
2, rue des Salenques
TOULOUSE
Tél : 21.86.67

ooo

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur .. .. MM. FLORIO.
Directeurs honoraires .. .. PONS.
DARRASPEN
Professeur honoraire .. .. LOMBARD.

PERSONNEL ENSEIGNANT

Chaire de Pharmacie-Toxicologie.
— Professeur titulaire .. .. GODFRAIN.
— Maître-Assistant .. .. Mme BURGAT-SACAZE
Pharmacie - Toxicologie.

Chaire de Physique-Chimie biologiques et médicales.
— Professeur titulaire .. .. MM. RICO.
Physique biologique et médicale. Chimie biologique et médicale.

Chaire d'Anatomie des Animaux domestiques.
— Professeur titulaire .. .. PAVAUX.
Anatomie descriptive. Extérieur. Anatomie appliquée. Tératologie.

Chaire de Physiologie - Thérapeutique.
— Professeur titulaire. .. .. RUCKEBUSCH.
— Maître de Conférences, non Chef de Service .. .. FARGEAS.
Physiologie - Thérapeutique - Pharmacodynamie.

Chaire d'Histologie - Anatomie pathologique.
— Professeur titulaire. .. .. VAN HAVERBEKE
— Professeur sans chaire.. .. .. CABANIÉ.
— Maître-Assistant .. .. MAGNOL.
Histologie - Embryologie - Anatomie pathologique.

Chaire d'Hygiène et Industrie des aliments d'origine animale.
Professeur titulaire .. .. LABIE.
Maître-Assistant .. .. EECKHOUTTE
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale.

Chaire de Parasitologie et Maladies parasitaires.
Professeur titulaire .. .. BRIZARD.
— Maître-Assistant Agrégé .. .. DORCHIES.
Zoologie appliquée. Parasitol. externe. Parasitol. interne. Clinique

Chaire de Sémiologie et Pathologie médicale des équidés et carnivores.
— Professeur titulaire .. .. FLORIO.
— Professeur sans chaire.. .. .. LESCURE.
Maître-Assistant .. .. GUELFI.
Sémiologie et Pathologie médicale des équidés et des carnivores.
Législation vétérinaire et Déontologie. Clinique.

Chaire de Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour.
Professeur titulaire .. .. TOURNUT.
— Professeur sans chaire.. .. .. ESPINASSE.
— Maître-Assistant .. .. BÉZILLE.
Sémiologie et Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour. Clinique. Clinique ambulatoire.

Chaire de Pathologie chirurgicale.
- Professeur titulaire .. .. CAZIEUX.
Propédeutique et Sémiologie chir. Technique chir. Pathologie chir.

Chaire de Pathologie de la Reproduction.
- Professeur titulaire .. .. BERTHELON.
-- Professeur sans chaire.. .. .. ROYAL.
Sémiologie et Propédeutique. Pathologie de la reproduction. Obstétrique. Clinique.

Chaire de Maladies contagieuses. Zoonoses. Législation sanitaire.
-- Professeur titulaire .. .. SAURAT.
— Maître-Assistant Agrégé .. .. CHANTAL.
Maladies contagieuses. Zoonoses. Législation sanitaire.

Chaire de Pathologie générale. Microbiologie. Immunologie.
-- Professeur titulaire .. .. LAUTIÉ.
— Maître-Assistant .. .. MEIGNIER.
Microbiologie. Immunologie. Pathologie générale.

Chaire de Zootechnie et d'Economie rurale.
-- Professeur titulaire .. .. QUEINNEC.
— Maître-Assistant .. .. DARRÉ.
Ethnologie. Génétique appliquée. Hygiène générale. Zootechnie. Elevage. Economie générale et des productions animales.

Chaire d'Alimentation.
- Professeur titulaire .. .. FALIU.
-- Maître de Conférences, non Chef de Service .. .. GRIESS.
Botanique appliquée et Bromatologie. Agronomie. Alimentation.

COURS COMPLEMENTAIRES - CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies infectieuses .. .. MM. MONNIER.
Aspect médical des Zoonoses .. .. ARMENGAUD.
Energétique .. .. LABOUCHE.
Initiation à l'informatique biomédicale.. .. .. FERNET.
Agronomie .. .. COMBRET.
Métabolismes .. .. RAYNAUD.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats.
(Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924.)

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde affection pour les immenses sacrifices consentis pour nous.

A MA FEMME

A MES ENFANTS

Avec tout mon amour et toute ma tendresse.

A MES GRAND-MERES

Très affectueusement.

A MES BEAUX PARENTS

Témoignage de reconnaissance filiale.

A MA FAMILLE

A MONSIEUR LOUAINTIER

A MONSIEUR LE MAUX

Docteurs Vétérinaires

Avec mes remerciements.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR RUFFIE
de l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de cette thèse.
Hommages très respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR LAUTIE
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de l'Ordre National du Mérite

qui a bien voulu nous apporter
son bienveillant appui pour cette thèse.
Hommages respectueux.

MONSIEUR LE PROFESSEUR SAURAT
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Chevalier de la Légion d'Honneur

que nous remercions d'avoir accepté
de faire partie de notre jury de thèse.
Hommages reconnaissants.

A TOUS NOS MAITRES DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE
DE TOULOUSE

A MONSIEUR NIZZA

Docteur Vétérinaire

Directeur du Laboratoire-Etable de Radiobiologie Appliquée C.E.A. Jouy-en-Josas.

En reconnaissance de sa haute bienveillance.

A MONSIEUR HAAG

Docteur Vétérinaire

Sous-Directeur du Laboratoire-Etable de Radiobiologie Appliquée C.E.A. Jouy-en-Josas.

En reconnaissance pour les excellents conseils qu'il a prodigués.

A MONSIEUR VAIMAN

Docteur Vétérinaire au Laboratoire-Etable

de Radiobiologie Appliquée C.E.A. Jouy-en-Josas.

Qui nous a inspiré ce travail et guidé dans son élaboration.

Nos remerciements les plus chaleureux.

A MADAME ARNOUX

du Laboratoire-Etable de

adiobiologie Appliquée C.E.A. Jouy-en-Josas.

En témoignage de notre reconnaissance

pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportée.

A TOUT LE PERSONNEL SCIENTIFIQUE

u Laboratoire-Etable de Radiobiologie Appliquée

C.E.A. Jouy-en-Josas.

t notamment les COLLABORATEURS DE MONSIEUR VAIMAN

AVANT-PROPOS

Les problèmes posés par le rejet des homogreffes ont incité à la recherche, chez les diverses espèces animales utilisées dans le domaine de l'expérimentation, de groupes d'histocompatibilité permettant une approche plus rationnelle de ces problèmes.

Après la découverte chez l'homme du système erythrocytaire ABO, la mise en évidence de systèmes d'histocompatibilité majeurs, notamment le système HLA de l'homme, (10) le système H2 de la souris (10), a amené à la recherche de systèmes analogues chez d'autres espèces, et en particulier chez le porc. Chez cette espèce, un tel système fut mis en évidence par VAIMAN et Coll. (29) au L.E.R.A (°) : le système SL-A.

Dans le cadre des travaux effectués dans ce Laboratoire sur les groupes d'histocompatibilité pouvant exister dans l'espèce porcine, notre travail personnel a consisté en l'étude et la mise au point d'une technique de Culture Mixte de Leucocytes (C.M.L.), afin de pouvoir utiliser cette méthode de typage de l'histocompatibilité parallèlement avec d'autres tests.

(°) L.E.R.A. Laboratoire-Etable de Radiobiologie Appliquée, Département de Protection, Commissariat à l'Energie Atomique, Jouy-en-Josas (78)

INTRODUCTION

Le phénomène immunologique, mis en cause lors du rejet des greffes de tissus ou d'organes, est de force variable. Ainsi un individu recevant différentes greffes primaires de peau de plusieurs donneurs, les rejettera après une durée de survie plus ou moins longue, alors que les greffes d'un même donneur sont rejetées après un même laps de temps. Ceci traduit des rapports antigèniques variables entre l'hôte et chacun des donneurs.

Cette histoincompatibilité est sous la dépendance de systèmes représentés au niveau des tissus par des antigènes dits antigènes d'histocompatibilité ou antigènes de greffes.

Ces antigènes d'histocompatibilité ont une stricte dépendance génétique (21). Des transplantations rénales chez l'homme ont des chances de succès totales entre jumeaux univitellins, celles-ci ont encore des chances de succès très importantes (dans la pratique associées avec un traitement immunodépresseur) entre frères HL-A identiques, elles diminuent nettement entre frères non HL-A identiques, pour devenir encore moins bonnes entre individus non apparentés (10).

La réussite des greffes est donc étroitement dépendante de la sélection Donneur - Receveur. Aussi il a été étudié divers tests capables de déceler l'histocompatibilité entre donneur et receveur; tests réalisés in vitro ou in vivo.

Les tests in vivo, cités pour mémoire, sont, le test d'histocompatibilité indirecte (dit du "troisième homme") étudié chez l'homme (23) et chez la souris (20), et le test du transfert lymphocytaire (22). Malgré leur intérêt surtout théorique ils sont peu employés étant d'un maniement difficile et d'interprétation délicate.

Plus importants, d'une manière pratique, sont les tests réalisés in vitro.
En premier lieu, le test de recherche des groupes sanguins. Le système A B O chez l'homme s'est révélé être un système d'histocompatibilité fort, mais le respect de la similitude erythro-phénotypique n'est cependant pas suffisant pour assurer la prise permanente d'une homogreffe (10) (22).

L'étude des antigènes plaquettaires (9) a permis de mettre au point un test avec la fixation du complément donnant de bons résultats, voisins de ceux obtenus avec les tests sérologiques.

Les cellules nucléées du sang représentent actuellement le matériel le plus important d'étude des antigènes d'histocompatibilité : elles sont le support essentiel de ces antigènes (10) (9) (11). Ceux-ci sont reconnus à l'aide d'allo-sérums provenant d'individus immunisés (femmes multipares, polytransfusés ou encore par injections de leucocytes, ou des greffes de peau chez des volontaires), par leuco-agglutination et surtout par leucocytotoxicité donnant des résultats constants et précis.

Tous ces tests ont permis la mise en évidence des systèmes d'histocompatibilité majeurs existant tant chez l'homme que chez les animaux étudiés (souris, chiens, rat, rhésus, porc).

Enfin on a mis au point un test cellulaire in vitro : la culture lymphocytaire mixte (C.L.M.) Test considéré comme une réaction immunologique primaire équivalente à une réaction de rejet dans l'organisme. Il est basé sur la transformation blastique des lymphocytes de deux souches différentes mises en présence.

La partie technique de l'étude de la C.L.M. chez le porc est l'objet essentiel de cette thèse.

— La transformation blastique.
In vivo le petit lymphocyte, dans certaines conditions, se montre comme une cellule active, notamment lors de son intervention dans le rejet des homogreffes. Ce phénomène a été également observé in vitro. En effet sous l'action de certains stimuli antigéniques ou de substances très variées, le petit lymphocyte se transforme en une grande cellule qui par son aspect et sa structure est identique au lymphoblaste.
Ce processus se traduit par une augmentation globale de la taille cellulaire portant essentiellement sur le cytoplasme. Le développement de l'appareil de Golgi, normalement rudimentaire devient important, ainsi que l'augmentation de l'activité pycnocytaire et l'hypertrophie des organites essentiels dans les synthèses comme le réticulum endoplasmique. L'emploi de précurseurs marqués par les isotopes radioactifs, montre que lors de cette transformation la cellule synthétise activement l'ARN et l'ADN, ainsi que des protéines, dont des immunoglobulines (15).

Ces modifications du petit lymphocyte sont induites par l'effet de différents facteurs que l'on peut grouper sous trois rubriques :

- Sous l'action de substances blastogéniques non spécifiques, leur action révélant alors un caractère universel. Parmi celles-ci est la phytohémagglutinine (PHA), protéine non toxique, extraite du haricot rouge Phaseolus vulgaris, d'utilisation très courante.

- Sous l'action de facteurs immunospécifiques. Ce sont les antigènes auxquels l'individu est sensibilisé. Le nombre de ces substances est presque illimité (constituants microbiens, parasitaires; protéines animales ou végétales; médicaments).

- Enfin en culture mixte de deux populations de lymphocytes d'origine différente.

Historique

Après que NOWELL en 1960 découvrit la propriété de la PHA de transformer la morphologie des leucocytes sanguins, et que CARSTAIRS identifia la source des cellules qui se transforment (le petit lymphocyte), HUNGERFORD réalisa pratiquement les premières cultures de leucocytes pour l'étude des chromosomes.

SCHREK et DONELLY en 1961 (15) observent pour la première fois la transformation blastique dans des cultures mixtes de leucocytes provenant de deux individus génétiquement différents.

Ils constatèrent après cinq jours de culture, des cellules transformées, qui par leur morphologie ressemblent aux cellules blastiques telles qu'elles se forment sous l'action de la PHA.

BACH et HIRSCHHORN (2), BAIN et Coll. (6) (5), (1964) ont étudié d'une manière détaillée les conditions et la cinétique de ce phénomène, notamment ils montrèrent que ces cellules au cours de leur transformation sont capables d'incorporer de la thymidine tritiée dans leur noyau.
BAIN et Coll. montrèrent également une corrélation entre la stimulation en C.L.M. et le génotype.
BACH et HIRSCHHORN, pour leur part indiquent la concordance entre le test d'histocompatibilité indirect dit du "troisième homme" et la C.L.M.

BACH et Coll. (1967) (4) étudient conjointement la culture leucocytaire mixte, la survie des greffes de peau et le typage lymphocytaire et concluent que le locus qui contrôle la stimulation en C.L.M. est le locus d'histocompatibilité majeur chez l'homme.

La C.L.M., chez le porc, est utilisée par VIZA et coll.(30). Ils confirment, à l'aide de ce

test, l'existence du système d'histocompatibilité majeur SL-A découvert par VAIMAN et Coll. (29) à l'aide des tests sérologiques (lymphocytotoxicité) et des greffes de peau.

Le travail que nous avons effectué au L.E.R.A. portait particulièrement sur la mise au point technique de la culture lymphocytaire mixte chez le porc.
Les résultats qui font l'objet de cette thèse représentent une étape dans les recherches effectuées dans ce laboratoire sur les groupes tissulaires du porc.

Cet exposé comportera trois parties :

- Matériels et Méthodes.
- Résultats expérimentaux.
- Discussion.

Le premier chapitre traitera des diverses méthodes ainsi que du matériel employés pour étudier les paramètres intervenant dans la C.L.M. chez le porc.
Nous y décrirons notamment la méthode de mesure de la radioactivité des cellules après utilisation par celles-ci de thymidine tritiée incorporée au milieu de culture. Elle nous permettra de juger de l'activité cellulaire.

Le second chapitre groupera les résultats expérimentaux concernant les principaux paramètres de la C.L.M.

Enfin le troisième chapitre discutera de la technique proprement dite de la C.L.M., et comportera une étude comparative succinte de la C.L.M. avec les allogreffes de peau et le typage sérologique (lymphocytotoxicité) pour trois familles de porcs.

CHAPITRE PREMIER

MATERIELS et METHODES

- ------ -

MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre nous exposerons les différentes techniques que nous avons été amené à utiliser lors de la mise au point de la culture mixte de leucocytes.
L'ordre de présentation choisi est l'ordre chronologique des opérations nécessaires à la mise en culture et à la mesure de l'activité cellulaire de transformation.

Nous avons ainsi deux parties :

A - La préparation des cultures

B - La technique de mesure de l'activité cellulaire

A - La Préparation des Cultures

Dans ce paragraphe nous exposerons, sous trois rubriques les opérations effectuées pour la mise en culture, c'est-à-dire :

I - La préparation des cellules;
II - Les conditions de culture;
III- La mise en culture proprement dite.

I - La préparation des cellules

Nous avons uniquement utilisé des cellules fraîches, préparées le jour même de la mise en culture.

a/ Les animaux

Un total de vingt porcs utilisés chacun plusieurs fois, servit à nos expériences: environ trente cinq mises en cultures se composant chacune en moyenne de cinq à six combinaisons.

Ces animaux se composaient de dix neuf porcs de race Large White, agés de deux à dix mois. Ils étaient répartis entre trois familles. En plus de ces dix neuf porcs, un porc de race Pittmann Moore, agé au début de notre travail de quatre mois, fut utilisé, notamment en culture témoin, vis-à-vis des porcs de race Large White.

b/- Le prélèvement de sang

Les prises de sang sont faites selon la méthode de CARLE et coll., (par ponction de la veine cave antérieure au niveau de la base du cou). Les animaux sont maintenus en décubitus dorsal, avec ou sans anesthésie générale au fluothane, suivant leur taille. La région est nettoyée puis aseptisée à l'alcool.

Le matériel de prises de sang consiste en des seringues de verre pyrex auxquelles sont adaptées des aiguilles de 70/20 pour les ponctions sur les plus gros animaux, et de 60/15 pour celles effectuées sur les porcs de deux à trois mois. Tout ce matériel est préalablement stérilisé à l'autoclave à 120°C.

Le sang est directement recueilli sur Héparine, sans phénol (Liquémine ROCHE), contenue dans la seringue, ceci à raison de 1 mg (100 UI) par ml de sang.

Les quantités de sang prélevées par animal sont fonction de la taille de celui-ci et des besoins des expériences envisagées. Couramment, 30 ml de sang étaient prélevés chez les porcs de trois mois. Cette quantité est suffisante pour permettre la culture de trente tubes; pour les expériences nécessitant un plus grand nombre de tubes (150 à 200 env.) 150 ml de sang étaient alors prélevés chez des porcs de six mois et plus.

c/- Obtention des Leucocytes

Le sang, une fois prélevé, est écoulé dans une éprouvette adaptée au volume de sang recueilli (éprouvette de 50 ml pour 30 ml de sang) (éprouvette en verre pyrex à fermeture par un bouchon à vis, verrerie SOVIREL).

Celle-ci est alors placée au bain-marie à 38°C, et inclinée à 45°, ceci pendant un temps, variable suivant les prélèvements, allant de 45 à 60 minutes : la hauteur du surnageant de la sédimentation des cellules du sang devant être à peu près égale à celle du culot. Au bout de ce délai, l'éprouvette est placée verticalement et laissée ainsi

10 minutes.

Le résultat de cette sédimentation est un culot composé essentiellement d'érythrocytes et un surnageant très riche en leucocytes. C'est ce surnageant qui servira d'élément de base à partir duquel seront prélevées les cellules à mettre en culture.

d/- Cellules répondantes et cellules stimulantes

1)- Culture mixte bidirectionnelle et culture mixte unidirectionnelle.

Entre les lymphocytes, provenant de deux souches différentes, cultivés ensemble , il y a stimulation réciproque. Le résultat de la mesure de la transformation lymphocytaire résultante est global et il est pratiquement impossible, dans ce cas de rapporter à chacune des deux souches le taux de transformation qui lui revient. Pour cela, il est parfois nécessaire de scinder la réaction bidirectionnelle par inhibition des possibilités de transformation des cellules d'une des deux souches, ces cellules sont alors dites stimulantes, et la réaction unidirectionnelle.

BACH et VOYNOW (3) signalent que la réaction unidirectionnelle, en plus de cette particularité fondamentale, permet une évaluation plus précise des résultats.

L'inhibition des possibilités de transformation des lymphocytes peut être obtenue de plusieurs manières : par action du froid (8), par action de la Mitomycine (3), par action des rayons X (16) (17). C'est cette dernière méthode que nous avons uniquement utilisée pour nos cultures unidirectionnelles, ceci, notamment pour sa simplicité d'emploi.

2)- Les cellules répondantes et le plasma autologue

Le surnageant obtenu lors de la sédimentation sanguine, est, après numération à la cellule de MALASSEZ, divisé en trois parties :

- une partie contenant largement le nombre de leucocytes nécessaires en cellules répondantes pour les cultures envisagées;
- une partie contenant, aussi largement, le nombre de leucocytes nécessaires en cellules stimulantes;
- le reste du surnageant, qui après centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes, donnera le plasma nécessaire :
  - pour diluer la suspension des cellules répondantes précédentes, afin de ramener leur concentration à 20.000 par mm3;
  - pour supplémenter le milieu synthétique en éléments nutritifs.

Généralement la supplémentation des milieux synthétiques est faite par du plasma ou du sérum autologue ou encore par du sérum de veau foetal. Nous donnons dans le chapitre suivant les résultats comparatifs de ces deux méthodes de supplémentation.

3)- Les cellules stimulantes

La partie du surnageant destinée à donner les cellules stimulantes (pour les cultures unidirectionnelles) est placée dans un cristallisoir en verre pyrex de 7 cm de diamètre et de 4,5 cm de hauteur, et fermé par un couvercle en verre. Ce cristallisoir est alors placé sous la source d'émission de rayons X (appareil à rayons X Véga, C.G.R) de manière à ce que son couvercle s'applique sur le verre protecteur de l'appareil.

Une sonde reliée à un dosimètre (dosimètre universel Simplex) est fixée sur le fond du cristallisoir. Le tout est maintenu fixement en place par un support approprié.

Le réglage de la production des rayons X est obtenu avec une tension de 200 kvolts et une intensité de chauffage de 12 mA; le débit est de 200 R par minute. Une plaque de cuivre de 0,5 mm d'épaisseur est interposée à la sortie des rayons X et la distance foyer-objet est de 25 cm. Le dosimètre règle, en

fonction de la dose choisie, le temps d'émission des rayons X.

Une fois irradié, le surnageant est centrifugé à 600 *g* pendant 10 minutes. Le plasma est éliminé et le culot est remis en suspension dans une même quantité de milieu MAC COY. Les leucocytes sont alors comptés à la cellule de MALASSEZ et la suspension ajustée à une concentration de 20.000 leucocytes par mm^3.

II - Les Conditions de culture.

Une fois les cellules préparées ainsi qu'il vient d'être décrit, elles sont mélangées dans le milieu de culture supplémenté, pour être distribuées dans les tubes puis mises en incubation.

a/- Le milieu de culture

Il existe de nombreux milieux de culture synthétiques dont les plus utilisés sont le milieu de EAGLE et le milieu de PARKER (utilisé par HUNGERFORD et Coll. en 1959 pour les premières cultures de leucocytes).
Celui que nous avons utilisé est le milieu MAC COY (milieu MAC COY 5a, avec $NaHCO_3$; EUROBIO) ayant déjà donné toute satisfaction pour la culture de leucocytes de porc (HAAG (14). Nous donnons en annexe sa composition complète. Ce milieu possède tous les acides

aminés essentiels et il est supplémenté en antibiotiques (pénicilline G, streptomycine, néomycine).

Il est livré en sachet de poudre à dissoudre dans de l'eau bidistillée. Pour cela nous remplissons une éprouvette en verre de contenance 1 litre, de 500 ml d'eau bidistillée et nous écoulons régulièrement la poudre à la surface de l'eau maintenue en mouvement par un agitateur magnétique. Le sachet est rincé plusieurs fois avec la quantité d'eau restante pour faire 1 litre.

Cette dissolution doit être la plus courte possible afin d'éviter une perte trop sensible de CO_2 lors de l'agitation, le pH final devant être de 7,4.

Ainsi préparé, le milieu est stérilisé par filtration sur filtre millipore de 0,22 microns, et conservé dans des flacons hermétiquement bouchés et complètement remplis.

Au milieu MAC COY est ajouté un supplément nutritif constituépar du plasma ou du sérum autologue des cellules répondantes.

Ce supplément est destiné à amener au milieu synthétique essentiellement deux types d'éléments indispensables à la survie prolongée des cellules:

- Des macromolécules protectrices et favorisant la croissance des cellules;

- Des petites molécules telles que nucléosides, vitamines, hormones, co-enzymes, absentes dans le milieu synthétique au moins en partie (19). Nous verrons dans le chapitre suivant l'utilisation de ces suppléments et les résultats qu'ils ont donnés.

b/- Les tubes de culture.

Nous avons utilisé deux sortes de tubes de culture : des tubes en plastique FALCON (FALCON Plastics, Los Angelès) de 16 x 150 mm à fermeture à vis; et des tubes en verre pyrex (verrerie JOUAN, Paris) de 15 x 90 mm fermés par des bouchons en caoutchouc (Méca-Vigor,3A,) et à fond hémisphérique.

c/- La phase gazeuse

D'après LING (19) un air enrichi à 5% de CO_2 semble être l'atmosphère optimum lorsque la hauteur du liquide dans le tube est d'environ 2 cm.
Cette condition nous a guidé dans le choix des tubes ainsi que dans le choix de la quantité de milieu en rapport avec la qualité de ce milieu (avec $NaHCO_3$):

$$(NaHCO_3 \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2^+ + OH^-)$$

d/- La température d'incubation

La température d'incubation choisie est de 38,5°C. C'est la température physiologique moyenne du porc (18). Elle est utilisée par HAAG (14) pour des cultures de leucocytes de porc.
Les tubes sont placés dans un bain-marie durant tout le temps déterminé de la culture.

III- La mise en culture proprement dite

C'est l'ensemble des opérations ayant pour objet la répartition des cellules dans le milieu précédemment décrit.

a/- Le nombre de tubes utilisés par réaction.

Une réaction correspond à une culture de deux souches données de leucocytes avec un ensemble de paramètres bien déterminés. Au cours de nos expériences ces paramètres ont été étudiés à l'intérieur d'une ou de plusieurs réactions.
Le nombre de tubes utilisés par réaction est de 5, recevant ainsi chacun la même quantité de mélange milieu-cellules et placés dans des conditions identiques.

b/- Préparation du mélange milieu-cellules

A ces 5 tubes identiques, correspond un pool où se fait le mélange milieu-cellules suivant les proportions étudiées dans le chapitre suivant.

Ce pool est fondamentalement constitué comme suit :

- une quantité nécessaire de milieu MAC COY;

- une quantité de plasma ou de sérum suivant un pourcentage défini en tenant compte de celui amené par la suspension cellulaire répondante (ces cellules restent dans leur plasma d'origine);

- une quantité définie de chaque population cellulaire (ajustée chacune à 20.000 leucocytes par mm^3) suivant la concentration finale recherchée.

Les pools sont préparés dans des Erlen-Meyer en verre pyrex de 50 ml de volume et fermés par des bouchons à vis (verrerie SOVIREL). La mesure des volumes est faite à l'aide de pipettes plastiques (FALCON) stérilisées par irradiation gamma.

c/- Répartition du pool dans les tubes et mise en place de l'atmosphère

Une fois le pool complétement préparé, il est aussitôt distribué en quantité égale dans chacun des 5 tubes. Cette distribution est faite à l'aide d'une seringue automatique en verre de 5 ml. de volume total.

Avant d'être fermé, chaque tube reçoit l'atmosphère constituée d'air à 5% de CO_2, ceci à l'aide d'une pipette PASTEUR, montée de manière stérile et reliée au réservoir de cette atmosphère (CO_2:5,0% $\pm$ 0,1% ; O_2: 19,3% $\pm$ 0,1% ; N_2 : QS) (Bouteille de $8m^3$ AIR LIQUIDE).

Une fois le débit réglé faiblement, l'extrémité de la pipette trempe de 1 à 2 mm dans le liquide, il se forme alors des bulles qui montent dans le tube. L'opération est arrêtée avant que celles-ci atteignent complètement l'extrémité libre du tube. Celui-ci est alors immédiatement bouché par le bouchon en caoutchouc. Les tubes sont aussitôt placés au bain-marie.

B- Technique de mesure de l'activité cellulaire de transformation.

Actuellement, trois méthodes semblent possibles pour déterminer l'activité

cellulaire de transformation : l'examen microscopique après coloration, l'autoradiographie et le comptage en scintillation liquide d'une radioactivité.

L'examen microscopique ne permet pas des mesures suffisamment précises et surtout ne permet que très difficilement des comptages comparatifs.

L'autoradiographie demande une longue préparation des plaques et présente une assez grande complexité dans son utilisation.

Le comptage en scintillation liquide fut la technique de mesure que nous avons retenue, ayant un spectromètre à notre disposition.

Comme nous l'avons vu, au cours de la transformation blastique, la synthèse de l'ADN est notablement accrue. Cette synthèse importante d'ADN reflète le niveau de l'activité de transformation blastique.

L'adjonction dans un milieu de culture d'un précurseur de l'ADN, marqué d'un isotope radioactif, permet, après utilisation par la cellule de celui-ci, de connaître par la mesure de la radioactivité, au niveau des seules cellules, le niveau de synthèse d'ADN et donc de la transformation blastique. La radioactivité résultante étant faible, sa

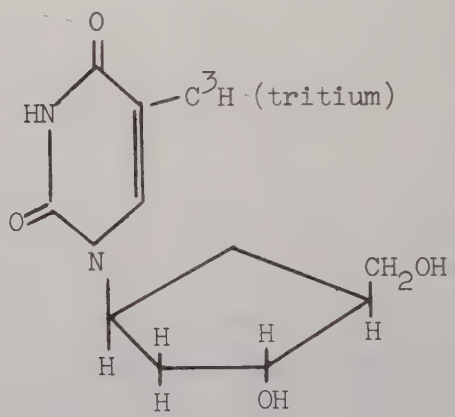
mesure en scintillation liquide donne les résultats les plus précis et permet facilement les comparaisons.

I- Incorporation de thymidine tritiée

a/- Préparation de la solution de thymidine ^{3}H

La thymidine utilisée est de la thymidine méthyle marquée au tritium, d'activité spécifique de 15 Ci par mMole (fournie par le D.R.E, C.E.A.).

Thymidine 2 - Déoxyriboside :



Livrée en solution aqueuse stérile de 1mCi sous 0,5 ml, pour notre utilisation nous ajustons l'activité à 20 µCi par ml (0,22 µg/ml) par dilution dans du P.B.S. (composition en annexe).

b/- Utilisation de la thymidine tritiée

Après un certain temps d'incubation (variable suivant les expériences) nous ajoutons

à chaque tube : 0,1 ml de la solution de thymidine ^{3}H à 20 µCi/ml soit 2 µCi. Aussitôt rebouchés, les tubes, après une légère agitation, sont replacés dans le bain-marie, et laissés ainsi en incubation pendant 5 heures.

Pour BACH et VOYNOW (3) ce délai est optimal pour l'utilisation par les cellules de la thymidine. BAIN (7) signale que, jusqu'à 6 heures d'incubation, l'utilisation par la cellule de la thymidine est constante, celle-ci diminuant rapidement par la suite du fait de la dégradation par les enzymes cellulaires de la thymidine non encore utilisée.

II- Notions sur la scintillation liquide

Le phénomène de scintillation dû à la radioactivité, fut utilisé pour la première fois par RUTHERFORD en 1903. Depuis, grâce au développement de l'électronique, des scintillateurs perfectionnés ont permis d'utiliser ce phénomène d'une manière pratique.

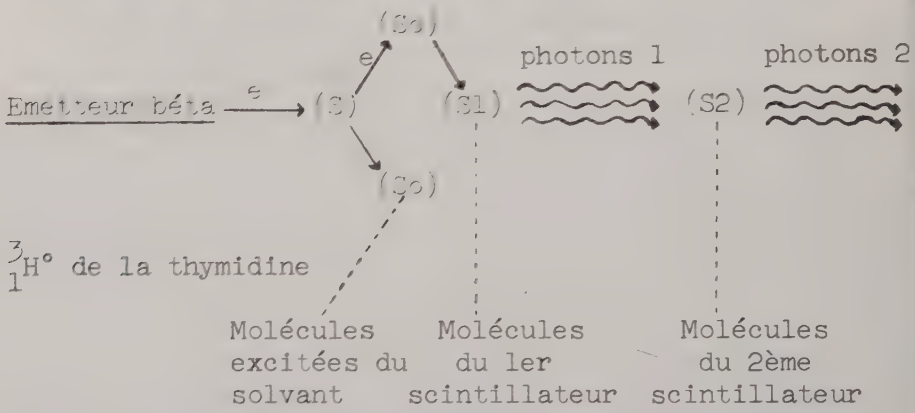
La technique de scintillation liquide est aujourd'hui la méthode la plus utilisée pour le comptage de faibles émetteurs béta comme le ^{3}H:

$$^{3}H \left({}^{3}_{1}H^{\circ} \rightarrow {}^{0}_{-1}\beta (0{,}0185 \text{ Mev}) + {}^{3}_{2}He \right)$$

L'avantage de la scintillation liquide est d'introduire le corps émetteur béta dans

la substance scintillante; ainsi la probabilité de rencontre du rayonnement bêta et de la substance scintillante est grande, le photon qui en est issu peut être détecté facilement.

Schéma du mécanisme de la scintillation liquide



Le rayonnement bêta agit sur le solvant (S) et donne une molécule excitée S_o ; la molécule excitée du solvant transfert son excitation à d'autres molécules scintillantes (S_1) puis (S_1) vers (S_2).

La substance scintillante se compose donc d'un solvant, toujours un hydrocarbure aromatique, et de deux scintillateurs : substances capables d'émettre des photons de longueur d'onde lambda compatible avec la réponse des photomultiplicateurs. Le scintillateur primaire émettant des photons de trop courte longueur d'onde, on ajoute un scintillateur secondaire pour augmenter la longueur d'onde.

Le spectromètre destiné à la mesure de

la scintillation liquide se compose donc essentiellement de photomultiplicateurs capables de convertir la lumière en impulsions électriques proportionnelles à la lumière issue des scintillateurs et de rendre celle-ci mesurable.

III- Préparation des échantillons pour le comptage en scintillation liquide

Les échantillons destinés au comptage en scintillation liquide doivent répondre à deux conditions principales :

1) être parfaitement solubles dans le liquide scintillant (solvant, hydrocarbure aromatique, et scintillateurs 1 et 2) de manière à ce que la géométrie soit constante dans l'espace et dans le temps;

2) être de coloration la plus faible possible afin de ne pas entraîner un affaiblissement lumineux pouvant perturber le résultat de la mesure de la radioactivité propre.

La préparation des échantillons a été faite suivant la méthode préconisée par LING (19). Elle nous a donné toute satisfaction.

Après la phase de 5 heures correspondante à l'incorporation de la thymidine tritiée, on arrête celle-ci en ajoutant à chaque tube 0,5 ml de solution de thymidine non radio-

active à 2g par litre (soit 1 mg). La dilution de la thymidine tritiée se trouve ainsi très grande et son incorporation tend vers zéro.

Les tubes sont ensuite centrifugés ainsi à 650 g pendant 10 minutes. Le surnageant (le milieu) est délicatement enlevé à l'aide d'une pipette PASTEUR reliée à une pompe à vide réglée sur un très faible débit. On ajoute ensuite 4 cm^3 de P.B.S. par tube; ceux-ci après agitation, sont centrifugés à 650 g pendant 10 minutes. Le surnageant est alors enlevé dans les mêmes conditions.

On verse alors 4 cm^3 d'une solution à 5% d'acide trichloracétique; les tubes sont agités puis centrifugés à 1200 g pendant 10 minutes. Ceci est recommencé deux fois.

A l'action de l'acide trichloracétique fait suite l'action de deux lavages avec du méthanol sous un même volume de 4 ml; les tubes sont centrifugés dans les mêmes conditions.

Le dernier culot ainsi obtenu, est mis à sécher à l'étuve à 40°C. Une fois complètement sec, on ajoute, sur ce culot, 0,2 ml d'une solution aqueuse de soude 1N. Les tubes sont, après bouchage, placés au bain-marie à 60°C pendant 30 minutes.

La solution ainsi réalisée est transvasée dans les pots à scintillation en verre

(INTERTECHNIQUE) et mélangée au liquide scintillant. Ce transvasement est effectué à l'aide d'une pipette PASTEUR; la solution est retirée du tube et rejetée dans le pot à scintillation, puis le tube et la pipette sont lavés cinq fois avec 0,4 ml de méthanol transvasé de la même manière. Enfin on ajoute, dans chacun des pots, 10 ml de liquide scintillant composé comme suit :

- Xylène	100 ml
- Triton-X-100	50 ml
- P.P.O	0,6 g
- Diméthyl P.O.P.O.P	0,012 g

Les pots fermés et agités sont placés à l'obscurité et à +4°C pendant 48 heures avant d'être comptés dans le spectromètre (spectromètre à scintillation liquide SL 40 INTERTECHNIQUE).

Le comptage est effectué à + 4°C et chaque pot (correspondant à un tube) est compté pendant 10 minutes. Les résultats sont exprimés en coups par minute (c.p.m.).

Les résultats ainsi exprimés traduisent l'intensité du phénomène de transformation blastique pour chaque réaction étudiée; ils vont nous permettre d'analyser les divers paramètres de la C.L.M., objet du prochain chapitre.

CHAPITRE DEUXIEME

RESULTATS EXPERIMENTAUX

- ----- -

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Pour l'étude des principaux paramètres intervenant dans la culture mixte, objet du présent chapitre, nous reprendrons le plan établi au chapitre précédent.

A - La préparation des cultures

I - La préparation des cellules

- Le prélèvement de sang

Le prélèvement de sang chez le porc suivant la méthode décrite précédemment (chapitre I, A, I, b) ne présente, pour cette étude, qu'un seul problème : celui de la stérilité des opérations. Pour ceci il nous a semblé préférable d'anesthésier les porcs, même ceux de petite taille; le prélèvement étant réalisé dans les meilleures conditions d'hygiène.

La plupart des auteurs utilisent l'héparine comme anticoagulant; LING (19) la signale comme étant préférable à tous les autres.
La dose d'héparine utilisée (100 UI/ml de sang) est relativement importante, mais elle permet d'éviter tout risque de microagglutination dans la seringue de prise de sang, et permet une meilleure sédimentation des cellules, en particulier des hématies; elle nous a permis d'éviter l'utilisation de substances

accélératrices de la sédimentation tel que le plasmagel (ROGER BELLON) ou le dextran.

- L'obtention des leucocytes

La plupart des auteurs utilisent la sédimentation, comme première étape dans la préparation des leucocytes; elle est faite avec ou sans substances accélératrices. La contamination par les hématies du surnageant de la sédimentation suivant la méthode décrite : (Chap.I, A, I, c), est plus importante que lors de l'utilisation des substances accélératrices: le surnageant contenant en moyenne 10 à 15 hématies pour I leucocyte; alors que lors de l'utilisation de substances accélératrices, elle n'est que de 2 à 3 hématies par leucocytes, LING (19).

D'après BAIN - VAS - LOWENSTEIN (6), la contamination des cultures par les hématies, ne semble pas avoir d'importance, que celles-ci soient étrangères ou non aux cellules répondantes.

En suivant notre technique de sédimentation, le surnageant contient, en moyenne, de 22.000 à 45.000 leucocytes par mm^3. (Moyenne de 17.000/mm^3 dans le sang entier, DUBIEZ (12)).

Le pourcentage de lymphocytes est assez important; il se situe entre 60 et 70%

(moyenne 54% dans le sang entier, DUBIEZ (12)), et ce taux est constant. La proportion de leucocytes dans le surnageant dépend largement du temps de sédimentation; si celui-ci dépasse 60 minutes environ, cette proportion diminue très rapidement. Aussi, expérimentalement, nous avons défini comme temps optimum de sédimentation, le temps nécessaire à ce que la hauteur du surnageant soit sensiblement égale à celle du culot constitué essentiellement par les hématies.

- Essais de cultures avec des populations très enrichies en lymphocytes

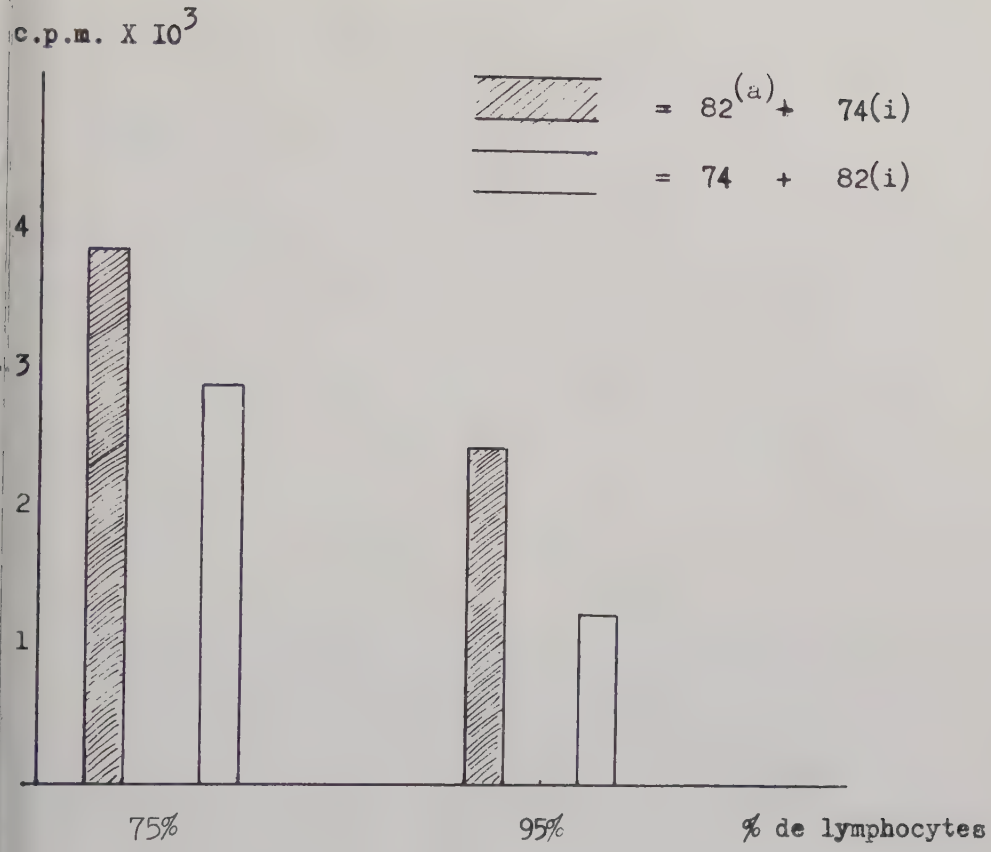
Le petit lymphocyte, étant la cellule qui subit la transformation blastique lors des réactions immunologiques, il nous a paru intéressant de comparer des cultures faites, avec des populations de leucocytes contenant 60 à 70% de lymphocytes, (surnageant de notre sédimentation), d'une part, et des cultures faites avec des populations de leucocytes, très riches en lymphocytes, soit 95% en moyenne, d'autre part. Ces dernières suspensions sont obtenues par passage du sang entier sur du coton de verre, selon la technique de HILDEMAN, adaptée au porc par VAIMAN et Coll. (28).

Pour chaque type de culture, nous avions les mêmes donneurs, et, les concentrations

finales en leucocytes étaient identiques. Le graphique I donne les résultats obtenus.

Malgré les variations observées, à l'intérieur de chaque type de culture, la réponse, (la stimulation), est plus importante pour les cultures où le pourcentage de lymphocytes est le plus faible.

Pour certains auteurs, cela pourrait laisser supposer que d'autres leucocytes que le petit lymphocyte, jouent un rôle dans le phénomène de transformation blastique, tels que les monocytes, GORDON (13); les plaquettes ne semblent jouer aucun rôle, BAIN et Coll. (6). Pour notre part, il nous semble, qu'une manipulation telle que le passage sur coton de verre, peut être traumatisant pour les cellules et, de ce fait, entraîner une diminution de la vitalité des cellules en culture.



GRAPHIQUE I - Comparaison de cultures faites à partir de suspensions normales (75% de lymphocytes) et de suspensions riches en lymphocytes (95%)
(Réactions unidirectionnelles)

- Concentration finale en leucocytes pour chaque souche : 1 x 10^6 / ml
- Temps de culture : 120 h - Cellules stimulantes irradiées à 1200 R
- Incubation pendant 5 h avec 2 µCi de thymidine ^3H
- Milieu MAC COY avec 10% de plasma autologue 4 ml par tube
- (i) : souche irradiée
- a : numéro du porc

- Les cellules stimulantes : irradiations aux rayons X

L'irradiation aux rayons X, pour obtenir les cellules stimulantes (cellules ayant perdu leurs possibilités de transformation), fut choisie, d'une part, en raison de la simplicité des manipulations (tout le matériel étant à notre disposition), et d'autre part, elle présente, par rapport à d'autres techniques comme celle utilisant la mitomycine par exemple, l'avantage d'éviter de nombreux lavages des cellules.

De nombreux auteurs utilisent cette technique; leurs résultats, quant à la dose d'irradiation, sont concordants.

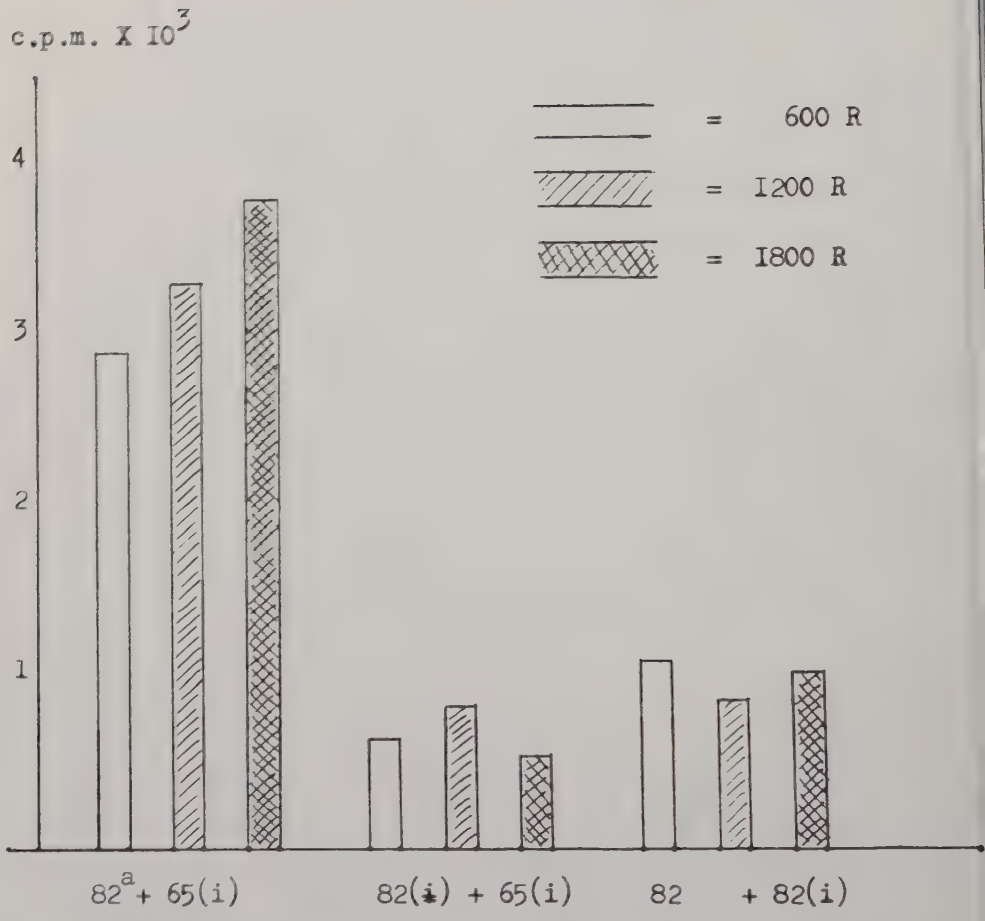
KASAKURA et LOWENSTEIN (16) (17) constatent qu'à partir de 400 à 800 R toute transformation de la part des cellules irradiées en culture mixte est négligeable et, que les leucocytes irradiés à des doses de 1000 à 1500 R sont capables de stimuler des lymphocytes étrangers non irradiés.

Pour notre part nous avons essayé 3 doses différentes de rayons X : 600 R, 1200 R, et 1800 R.

Le graphique II montre les résultats obtenus. La stimulation obtenue par les cellules irradiées (i) du porc 65 sur les cellules du

porc 82 est pratiquement la même quelles que soient les doses d'irradiation des cellules du porc 65. On constate, d'autre part, que la culture mixte des cellules irradiées des porcs 82 et 65 ne présente aucune transformation appréciable, ainsi que la culture mixte des cellules du porc 82 irradiées et non irradiées.

Compte tenu de ces résultats nous avons retenu, pour la suite de nos expériences, la dose de 1200 R.



GRAPHIQUE II- Comparaison de trois doses de Rayons X (Réactions unidirectionnelles).

- Concentration finale en leucocytes pour chaque souche : 1 x 10^6 /ml
- Temps de culture : 120 h - Milieu MAC COY avec 10% de plasma autologue, 4 ml par tube, Incubation pendant 5 h avec 2 μCi de thymidine ^3H
- (i) : souche irradiée
- a : numéro du porc

II - Les conditions de culture.

a/- Le milieu de culture

- Le supplément nutritif, nature et quantité

- Quantité de plasma ou sérum dans le milieu

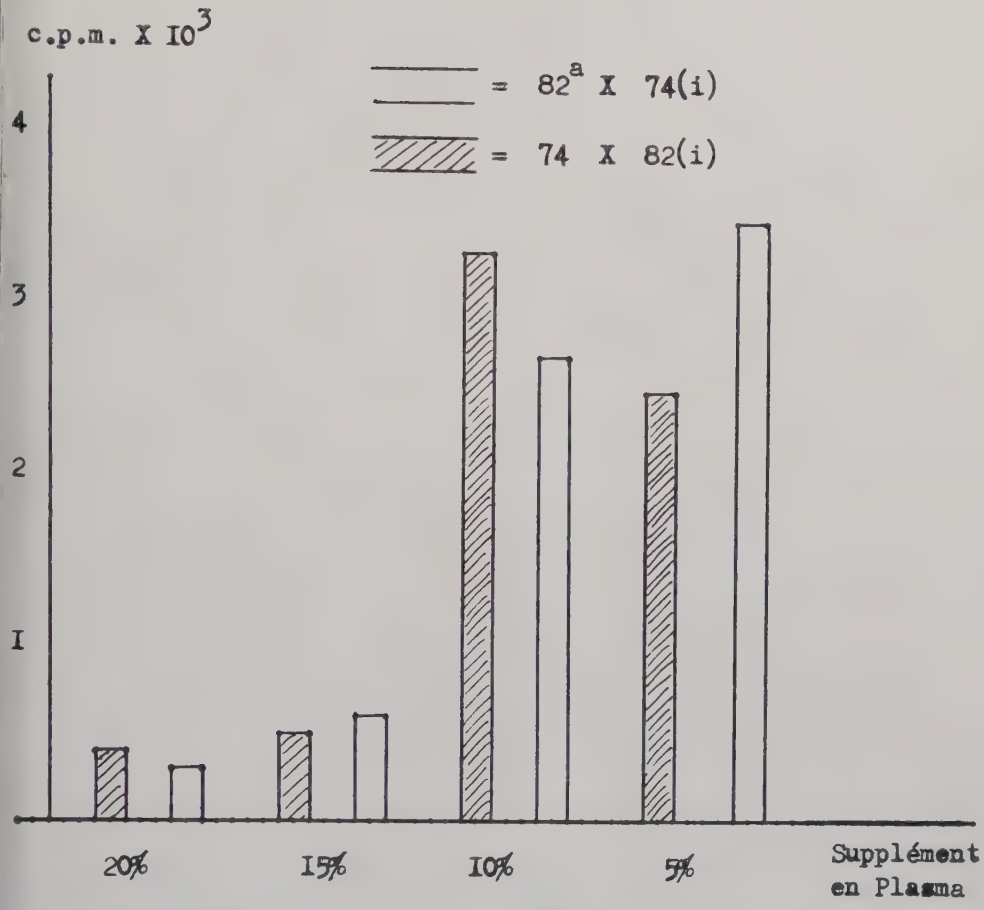
Nos premiers essais de culture furent faits avec du plasma autologue des cellules répondantes; aussi, avons-nous recherché d'abord, la quantité optimum.
L'utilisation du plasma autologue est fréquente dans les techniques utilisées. Cette supplémentation, en apportant les éléments nutritifs indispensables, évite les apports de protéines sériques, et, éventuellement, d'anticorps antilymphocytaires lors d'utilisation de sérum étranger, pouvant perturber la stimulation cellulaire, LING (19).

Pour le milieu MAC COY, utilisé, la quantité de plasma dépend du nombre de cellules mises en culture; aussi pour une concentration cellulaire finale de 1×10^6 cellules par ml, nous avons étudié l'influence de 4 concentrations différentes de plasma. Les résultats de cette expérience sont donnés dans le graphique III.

Nous constatons ainsi, que pour les conditions définies ci-dessus, et après 5 jours d'incubation, un taux de plasma supérieur

à 10% semble défavorable. Les taux de 10% et de 5% donnent des résultats pratiques identiques.

Pour la suite de nos expériences, le taux de plasma autologue fut fixé à 10%, assurant certainement une réserve nutritive suffisante.



GRAPHIQUE III - Comparaison de quatre pourcentages de plasma autologue en supplémentation du milieu MAC COY (Réaction unidirectionnelle)

- Concentration finale en leucocytes pour chaque souche 1 x 10^6 /ml
- Temps de culture 120 h - Incubation pendant 5 h avec 2 µCi de thymidine ^3H - Cellules stimulantes irradiées à 1200 R
- (i) : souche irradiée
- a : numéro du porc

- Nature du supplément nutritif

Comme nous l'avons dit, le plasma autologue des cellules répondantes, est largement utilisé, et souvent en concurrence avec le sérum de veau foetal. Ce dernier, d'après LING (19), serait plus riche en éléments nutritifs que le plasma adulte, sans, théoriquement, apporter d'anticorps sériques modifiant la réaction cellulaire. Ce sérum provoquerait cependant, un niveau de transformation non spécifique plus important. Lors de l'action de la PHA, le taux de transformation avec le plasma autologue est plus important qu'avec l'utilisation de sérum de veau foetal. Le graphique IV montre les résultats obtenus en cultures mixtes, d'une part avec du plasma autologue, d'autre part avec du sérum de veau foetal, toutes les conditions étant identiques, par ailleurs.

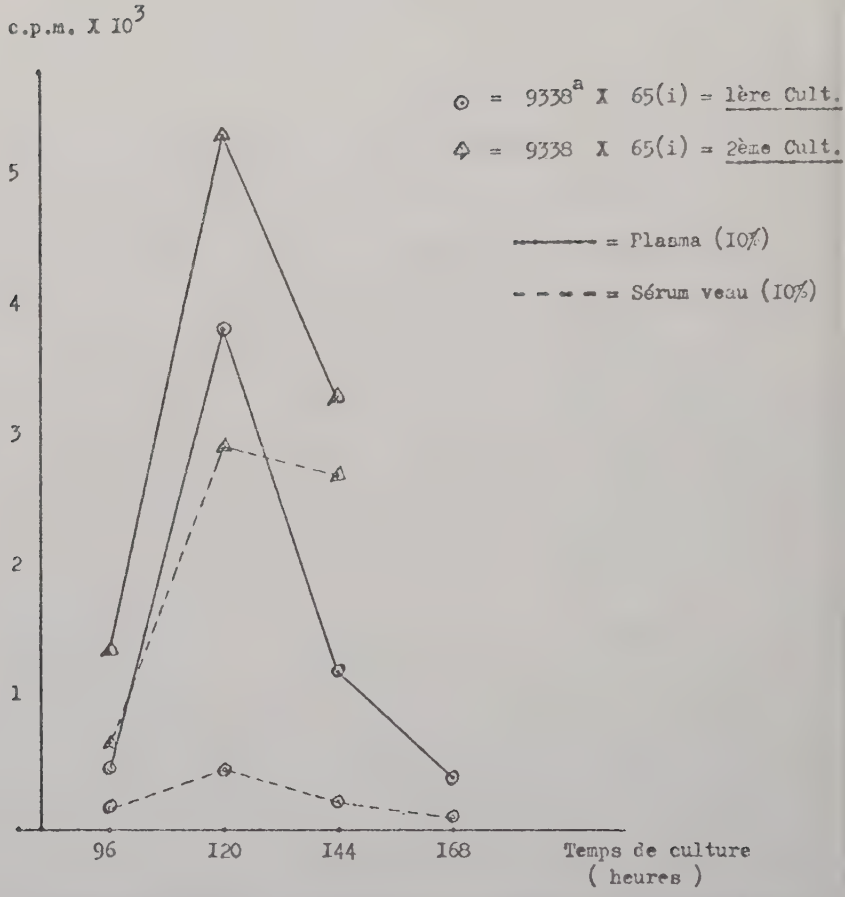
La transformation, obtenue avec les cultures faites avec du sérum de veau foetal est toujours inférieure à celles faites avec du plasma autologue, les différences étant supérieures à 2000 cpm. Pour les cultures témoins, aucune différence n'est observée, le niveau étant normalement bas (aux environs de 500 cpm).

b/ Les tubes de cultures

Les tubes en plastique FALCON ne nous ont pas donné satisfaction du point de vue de l'étanchéité aux gaz.

Nous avons été amené ainsi à utiliser les tubes de verre pyrex, précédemment décrits, avec une fermeture hermétique à l'aide d'un bouchon de caoutchouc (MECA VIGOR).

L'utilisation de ces tubes de verre nous permet par la suite, de les utiliser pour les centrifugations, évitant ainsi le transvasement du milieu et des cellules, source d'erreurs.



GRAPHIQUE IV - Comparaison entre du plasma autologue et du sérum de veau foetal

(réactions unidirectionnelles)

- Concentration finale en leucocytes pour chaque souche : 1 x 10^6 / ml
- Incubation pendant 5 h avec 2 μCi de thymidine ^3H
- Cellules stimulantes irradiées à 1200 R
- (i) : souche irradiée
- a : numéro du porc

c/ La phase gazeuse et la quantité de milieu

D'après LING (19), la hauteur dans les tubes, pour l'atmosphère composée d'un air enrichi à 5% de CO_2, est environ de 2 cm; ceci correspondant à un volume de 4 ml dans les tubes en verre que nous avons utilisés.

d/- Le temps de culture

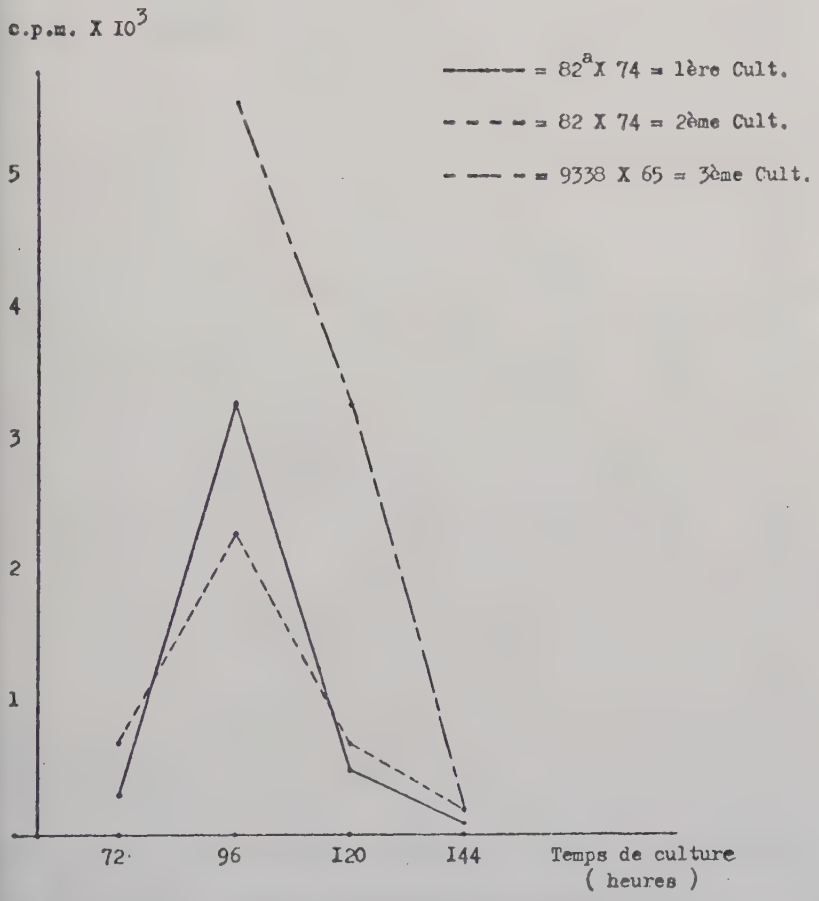
Le temps de culture dépend étroitement des autres conditions de cultures. Suivant les auteurs et les modalités techniques utilisées, le temps de culture varie entre 72 et 168 heures pour des cultures mixtes de leucocytes.
LING (19), RUDOLPH et Coll. (24), BACH et VOYNOW (3), pour des cultures mixtes unidirectionnelles, ont un temps d'incubation de 168 heures; BAIN et Coll (6) laissent en culture pendant 120 heures.
Nous avons réalisé des cultures mixtes uni et bidirectionnelles et cherché, pour les conditions de cultures précédemment définies, le temps optimum d'incubation : celui au terme duquel la transformation blastique est à son maximum.

Pour les cultures mixtes bidirectionnelles, le graphique V donne les résultats

obtenus. Il nous montre que le maximum de transformation se situe vers 96 heures d'incubation.

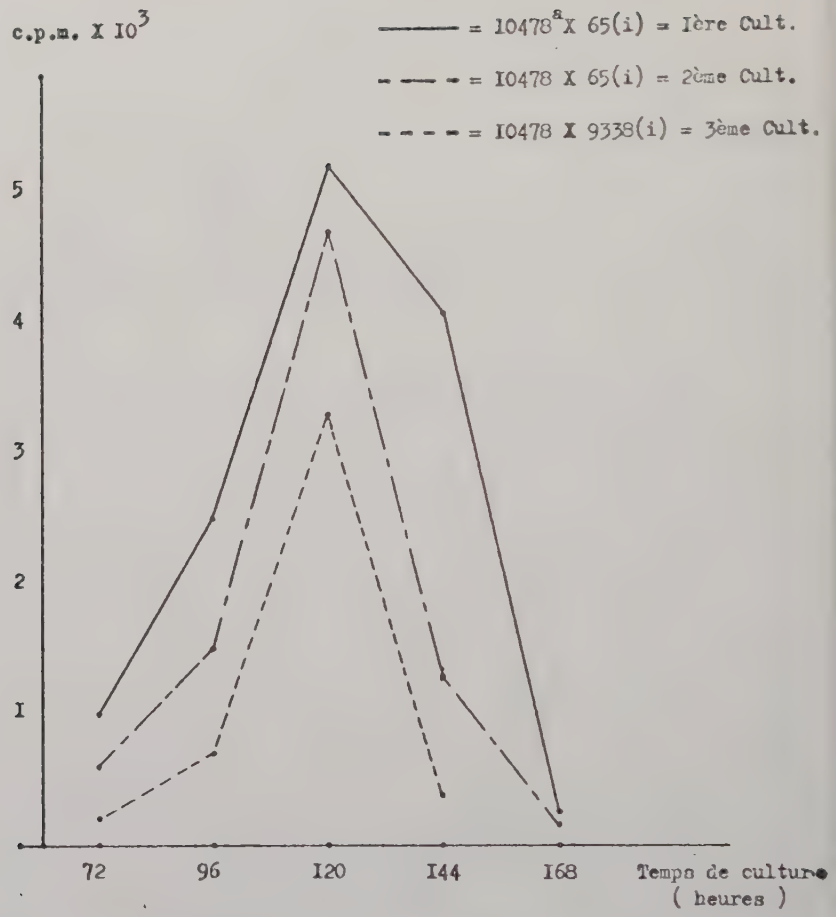
Pour les cultures mixtes unidirectionnelles, le graphique VI montre un maximum de transformation vers 120 heures d'incubation, le pic maximum étant, en l'occurence, très net.

Entre les deux types de cultures, la différence essentielle est, qu'un nombre double de cellules capables de se transformer, existe dans les cultures bidirectionnelles par rapport aux cultures unidirectionnelles.



GRAPHIQUE V - Comparaison entre quatre temps de culture en réaction bidirectionnelle

- Concentration finale en leucocytes pour chaque souche : 1 x 10^6 / ml
- Incubation pendant 5 h avec 2 µCi de thymidine ^3H
- Milieu MAC COY avec 10% de plasma, 4 ml par tube
- a : numéro du porc



GRAPHIQUE VI - Comparaison entre cinq temps de culture en réaction unidirectionnelle

- Concentration finale en leucocytes pour chaque souche : 1 x 10^6 / ml
- Incubation pendant 5 h avec 2 µCi de thymidine ^3H
- Milieu MAC COY avec 10% de plasma; 4 ml par tube
- Cellules stimulantes irradiées à 1200 R
- (i) : souche irradiée
- a : numéro du porc

Le milieu, dans le premier cas sera plus vite épuisé, ce qui peut expliquer la survie de 24 heures supplémentaires de cultures unidirectionnelles par rapport aux cultures bidirectionnelles.

D'autre part, la comparaison des graphiques V et VI, fait apparaître une réponse supérieure du taux de transformation dans les cellules unidirectionnelles. Ce fait peut être expliqué aussi, par la concentration cellulaire (en leucocytes capables de se transformer) moins importante dans nos cultures, d'où une meilleure utilisation du milieu par ces cellules.

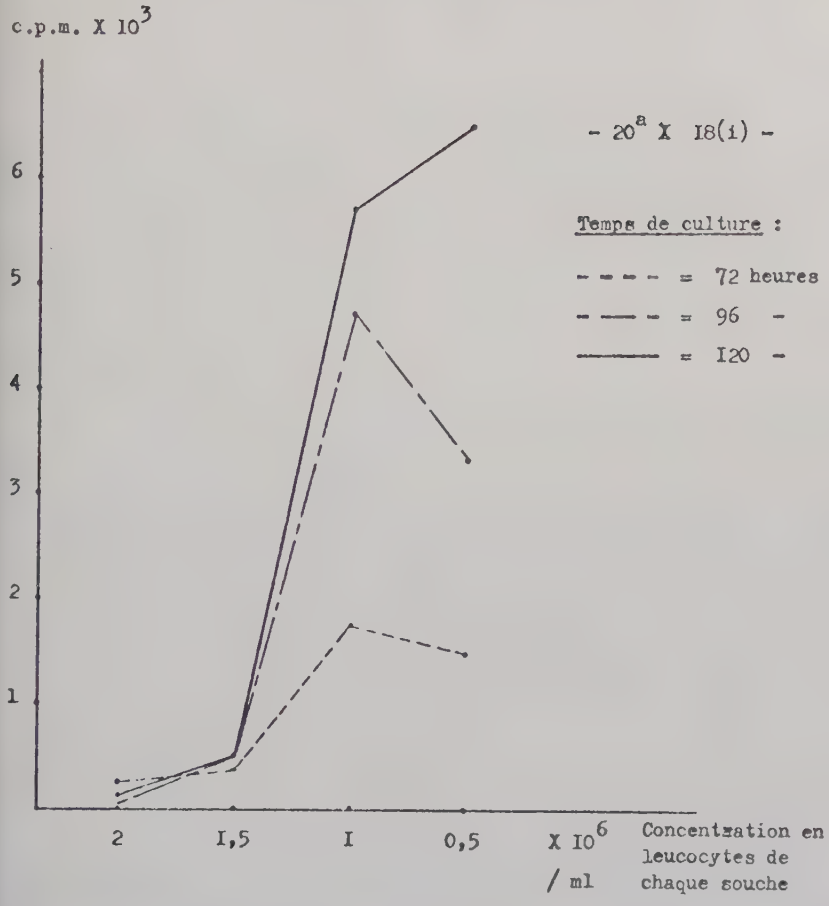
e/- Concentration cellulaire dans le milieu de culture

D'après LING (19), les lymphocytes en culture, ne peuvent survivre et croître à des concentrations inférieures à 10^5 cellules par ml. La concentration optimum est fonction du degré d'épuisement du milieu.

La concentration retenue par la plupart des auteurs est 10^6 leucocytes par ml de milieu, pour chaque souche.

Pour notre part (graphique VII), dans les conditions de cultures précédemment décrites, et notamment pour des temps d'incubation bien définis de 72, 96, et 120 heures,

et des concentrations de 0,5, 1, 1,5 et 2.10^6 cellules par ml, le couple de temps de culture-concentration cellulaire optimum (taux de transformation maximum) est de 120 heures de culture pour une concentration cellulaire de chaque souche de 1.10^6 leucocytes par ml. La concentration de $0,5.10^6$ cel.par ml donne des résultats assez proches, par contre, les concentrations supérieures (1,5 et 2.10^6 cel. par ml) sont nettement défavorables.



GRAPHIQUE VII - Comparaison entre le temps de culture et la concentration en leucocytes (réactions unidirectionnelles)

- Incubation pendant 5 h avec 2 µCi de thymidine ^3H
- Milieu MAC COY avec 10% de plasma; 4 ml par tube
- Cellules stimulantes irradiées à 1200 R
- (i) : souche irradiée
- a : numéro du porc

B - Technique de mesure de l'activité de transformation

La technique, qui fut utilisée tout au long de nos expériences, pour la mesure de l'activité cellulaire de transformation, est celle décrite au chapitre I - B.

Cette technique, nous donnant toute satisfaction quant à ses résultats et son utilisation pratique, ne fut l'occasion d'aucune expérience particulière. Seules des précautions dans le mouvement des cellules et des produits de défécation furent constamment apportées, pour obtenir une meilleure homogénéité des résultats entre les 5 tubes de culture identiques.

C - Schéma résumé des conditions de culture.

Le sang, recueilli sur héparine (100 UI / ml), est mis à sédimenter tel quel au bain-marie à 38°C pendant 45 à 60 minutes (variable suivant les prélèvements), dans une éprouvette inclinée à 45° puis placée verticalement.

Le surnageant, est, après numération, divisé en 3 parties :

- une destinée à donner les cellules répondantes;
- une destinée à donner, après irradiation aux rayons X (1200 R), les cellules stimulantes (pour les cultures unidirectionnelles);
- le reste, après centrifugation à 1200 *g* pendant 10 minutes, donnera le plasma autologue des cellules répondantes, nécessaire pour supplémenter le milieu à raison de 10%. Ceci pour chaque prélèvement de sang (pour chaque souche).

Les suspensions cellulaires, après vérification de la numération des leucocytes, sont ajustées à 20.000 leucocytes par mm^3 et distribuées en un pool de 20 ml (4 ml par tube et 5 tubes par réaction) constitué ainsi :

- 17 ml de milieu MAC COY;
- 1 ml de plasma autologue des cellules

répondantes ;

- 1 ml de la suspension des cellules répondantes à 20.000 leucocytes par mm^3 dans leur plasma;
- 1 ml de la suspension des cellules stimulantes (autre souche) à 20.000 leucocytes par mm^3 dans du milieu MAC COY.

Ce pool est distribué dans 5 tubes à raison de 4 ml par tube.

Après adjonction d'air à 5% de CO_2, les tubes sont bouchés hermétiquement et placés au bain-marie à 38,5°C. Le temps de culture total est de 120 heures pour les réactions unidirectionnelles, et de 96 heures pour les réactions bidirectionnelles.
Cinq heures avant l'expiration de ces délais, sont ajoutés, par tube, 2 μCi de thymidine ^3H, pour la mesure de la transformation blastique induite pendant l'incubation.

CHAPITRE TROISIEME

DISCUSSION

- ------ -

Discussion sur la Technique de la C.L.M.

Notre travail a consisté en la mise au point d'une technique de culture mixte de leucocytes chez le porc, ceci en cherchant à préciser les principaux paramètres intervenant dans la culture. Nous avons procédé par approche, à partir des résultats obtenus par divers auteurs dans d'autres espèces.

L'étude ainsi menée avait pour but essentiel de rendre la technique la plus reproductible possible dans ses résultats.

La C.L.M. peut se réaliser suivant deux modalités : en réaction bidirectionnelle ou en réaction unidirectionnelle. La première réaction donne la somme globale des transformations des deux souches de lymphocytes mises en présence, alors que la seconde ne donne que le résultat de la transformation d'une seule souche, stimulée par l'autre (celle-ci ayant perdu son pouvoir de transformation, par irradiation, sans perdre son pouvoir de stimulation).

Du point de vue des résultats fondamentaux des cultures, les deux types de réaction donnent des réponses concordantes : par exemple, des frères incompatibles (différents par SL-A) se stimulent aussi bien en cultures uni-, que

bi-directionnelles. Mais, la réaction unidirectionnelle, en même temps qu'elle permet de déterminer le sens de la réaction, montre un niveau de réponse proportionnellement plus élevé et donne des résultats plus homogènes. Egalement, on constate que l'un des deux sens est plus fort dans sa réponse, cela pourrait traduire des capacités de réponse ou de stimulation différentes suivant les combinaisons antigéniques mises en présence.
Malgré l'avantage d'une plus grande simplicité pour la culture bidirectionnelle, nous préférons la culture unidirectionnelle qui permet ainsi une analyse plus fine des résultats tout en ayant la meilleure reproductibilité.

En ce qui concerne les conditions de culture, avec ses trois principaux paramètres le milieu de culture, le temps de culture, et la concentration cellulaire, nos conclusions sont les suivantes :

Les conditions que nous avons définies entrent dans la moyenne de celles généralement utilisées par d'autres auteurs chez différentes espèces animales. Les lymphocytes sanguins du porc en culture mixte semblent se comporter d'une manière analogue à ceux des autres espèces.

Aussi en ce qui concerne le temps de culture, nous avons un optimum à cinq jours en réaction unidirectionnelle et de quatre jours en réaction bidirectionnelle, ensuite la réaction s'inhibe très rapidement, ceci sans renouveler le milieu; ces résultats sont ceux les plus souvent admis.

La concentration cellulaire, pour chaque souche, de 1 x 10^6 leucocytes par ml de milieu, est celle qui semble la plus favorable à la transformation lymphoblastique en C.L.M., et ceci pratiquement indépendamment de la quantité de milieu utilisé: de I à 5 ml par tube. Une quantité suffisante de milieu, est, à notre avis, utile pour maintenir un pH correct, nécessaire à la survie des cellules.

Ce pH est équilibré par l'atmosphère d'air enrichi à 5% de CO_2. Le milieu MAC COY, que nous avons utilisé, très complet dans sa composition, nécessite à cet endroit de grandes précautions dans sa préparation et sa manipulation (préparation rapide, flacons pleins et bien fermés, conservation en solution limitée). Pour ces raisons, ainsi que l'expérience nous l'a montré, le volume de 4 ml par tube est très satisfaisant, un volume plus faible semble par contre être généralement néfaste.

Le milieu que nous avons utilisé contient des antibiotiques (pénicilline G, streptomycine, néomycine), substances capables de provoquer une modification du comportement des cellules en culture pouvant induire une transformation des lymphocytes, et modifier ainsi les résultats. Les cultures témoins (où aucune stimulation ne doit avoir lieu) ne présentent pas de transformation significative; éliminer les antibiotiques, nous semblerait difficile étant donné les conditions de mise en culture.

Les études entreprises sur les divers paramètres de la C.L.M., nous ont permis de mettre au point une technique donnant une reproductibilité satisfaisante à l'intérieur d'une même culture (même porc, même matériel, même date). Cette reproductibilité reste cependant à améliorer entre des cultures identiques faites à quelques jours d'intervalle. Ce manque de reproductibilité se retrouve d'ailleurs généralement dans les résultats des études entreprises chez d'autres espèces, et est un des inconvénients majeurs de la C.L.M. Chez le porc, des variations dans la composition sanguine chez l'animal sain, sont assez fréquentes, ce qui entraîne des écarts dans les résultats.

Ainsi la technique venant d'être définie et étudiée, bien que susceptible de modifications permettant notamment d'améliorer sa reproductibilité, peut permettre dans sa forme actuelle, d'être utilisée en tant que test d'histocompatibilité en parallèle avec d'autres techniques.
Nous donnons à la suite, succintement, le cadre de cette utilisation et les premiers résultats obtenus.

Application de la technique de C.L.M. à l'étude du système d'histocompatibilité SL-A du Porc.

Le système d'histocompatibilité majeur SL-A du porc individualisé par des études sérologiques, et des allogreffes de peau (29), est contrôlé par un locus ou plusieurs loci très voisins. Il semble être homologue du système HL-A de l'homme. Génétiquement, il subit une ségrégation suivant les lois de MENDEL. Ainsi, si les parents possèdent les chromosomes suivants - A B pour la femelle, et C D pour le mâle; en première génération on obtient quatre groupes de porcelets = A C - A D - B C - B D.

Les études ont été réalisées à partir de vingt porcs de race "Large White", agés de

deux à cinq mois, appartenant à trois familles distinctes.
Le typage des animaux à l'intérieur de chaque fraterie a été réalisé par la microtechnique de lymphocytoxicité (27) (I), et au moyen des alloserums préparés au laboratoire (I).

La C.L.M. et le typage ont été conduits de manière indépendante.

- Le tableau I donne les résultats obtenus en C.L.M., en réaction bidirectionnelle, pour une fraterie de huit porcs. Ces résultats montrent, malgré certaines variations du niveau de comptage entre les diverses réactions, que les frères, identiques pour le système SL-A (par le typage sérologique), ne se stimulent pas, alors que, dans toutes les autres combinaisons, la stimulation a lieu.

- Les tableaux II et III donnent, chacun pour une fraterie de porcs, les résultats de la C.L.M. en comparaison avec la durée de vie des allogreffes de peau échangées entre frères. Pour une C.L.M. négative, frères compatibles pour SL-A, la durée moyenne de vie des allogreffes de peau est de 9,66 jours; pour une C.L.M. positive, frères incompatibles pour SL-A, elle est de 6,77 jours; la différence observée est significative à $p > 1\%$

pour le test U de Mann-Whitney. Pour la réaction bidirectionnelle le numérateur du rapport exprimant les résultats, correspond à la stimulation vraie et le dénominateur représente la synthèse d'ADN pour chaque type de cellules séparément. Dans le cas des cultures unidirectionnelles, le dénominateur correspond à l'incorporation de thymidine par les cellules en présence de ses propres cellules irradiées.
Le rapport est inférieur ou au plus égal à I dans les combinaisons compatibles en réaction bidirectionnelle alors qu'il est au-dessus pour les autres combinaisons, avec d'ailleurs de grandes variations. Pour les cultures unidirectionnelles où les deux frères sont identiques, le rapport peut dépasser I; cependant, le nombre de coups par minute est toujours faible et peut varier dans de grandes proportions. Néanmoins, la différence avec les combinaisons incompatibles est très nette.

Ainsi nous pouvons à l'aide de la C.L.M. suivant la technique utilisée, distinguer dans une famille de porcs les frères compatibles ou incompatibles pour SL-A.
Nous trouvons également une analogie des ré-

sultats entre la C.L.M., le typage sérologique, et les allogreffes de peau à l'intérieur du système SL-A du porc.

Un même locus semble donc déterminer les résultats de la sérologie, des greffes de peau, et de la C.L.M.

TABLEAU I

Résultats de la C.L.M. pour une famille de porcelets; en réaction bidirectionnelle

Combinaisons	Compta. c.p.m.	Résul	Combinaisons	Compta. c.p.m.	Résul
[a] [b] 558(BD)X560(AC) / 558 + 560	2171 [c] / 1201	+	560(AC)X561(BC) / 560 + 561	4078 / 1450	+
558(BD)X563(BD) / 558 + 563	701 / 1074	-	560(AC)X562(BC) / 560 + 562	2830 / 941	+
558(BD)X564(BD) / 558 + 564	449 / 1080	-	560(AC)X563(BD) / 560 + 563	1740 / 903	+
558(BD)X565(BC) / 558 + 565	4821 / 943	+	560(AC)X564(BD) / 560 + 564	1420 / 915	+
559(BD)X560(AC) / 559 + 560	11880 / 922	+	561(BC)X562(BC) / 561 + 562	586 / 1239	-
559(BD)X561(BC) / 559 + 561	5375 / 1220	+	562(BC)X564(BD) / 562 + 564	1142 / 605	+
559(BD)X562(BC) / 559 + 562	5023 / 907	+	563(BD)X564(BD) / 563 + 564	447 / 788	-
559(BD)X564(BD) / 559 + 564	680 / 646	-	564(BD)X565(BC) / 564 + 565	2258 / 657	+

a = Numéro du porc

b = Génotype déterminé sérologiquement pour le système SL-A

c = Le rapport représente le nombre de coups par minute de la C.L.M. par rapport à la somme des cultures individuelles des 2 types de cellules

TABLEAU II

Résultats de la C.L.M.; en réaction bidirectionnelle, dans une fraterie de porcs et de la durée de vie des allogreffes de peau échangées entre frères

Combinaisons de la C.L.M.	Compt. c.p.m.	Résul C.L.M	Combinaisons des greffes de peau donneur	Receveur	durée de vie (jours)	moyenne (jours) d
I9 X 20[a] / I9 + 20	340[b] / 794	-	20 / I9	I9 / 20	8,8,8 / ♀ I0,I0	8 / I0
I9 x 24 / I9 + 24	6830 / 704	+	24 / I9	I9 / 24	6,6,6, / 7,8,8,	6 / 7,6
I9 X 25 / I9 + 25	7883 / 898	+	25 / I9	I9 / 25	6,6,6, / 7,7,7,	6 / 7
2I X 23 / 2I + 23	I2I00 / 564	+	23 / 2I	2I / 23	7,7,6 / 7,7,7,	6,6 / 7
2I X 26 / 2I + 26	I9639 / 670	+	2I / 26	26 / 2I	7,7,7, / 7,7,7,	7 / 7
23 X 26 / 23 + 26	619 / 765	-	26 / 23	23 / 26	9,9,9, / I0,I0,I0	9 / I0
24 X 25 / 24 + 25	452 / 717	-	25 / 24	24 / 25	9,9,9, / 9,9,9,	9 / 9

a = Numéro des porcs

b = Le rapport représente le nombre de coups par minute de la culture mixte par rapport à la somme des cultures individuelles des 2 types de cellules

c = Greffe arrachée

d = La durée moyenne des allogreffes de peau entre frères dont la C.L.M. est négative est de 9,66 jours, et de 6,77 jours pour la C.L.M. positive. Différence à p 1% pour le test U de Mann-Whitney

TABLEAU III

Résultats de la C.L.M., en réaction unidirectionnelle, dans une fraterie de porcs et de la durée de vie des allogreffes de peau échangées entre frères

Combinaisons de la C.L.M.	Compt. c.p.m.	Résul. C.L.M	Combinaisons des greffes de peau donneur	Combinaisons des greffes de peau receveur	Durée de vie (jours)	Moy. (j.)
a b d 74(JL)x8I(KL) 74 + 74[d]	c 5261 652	+	8I 74	74 8I	8,8,8 -,6,7,	8 6,5
74(JL)x82(KM) 74 + 74	8525 652	+	nf nf			
74(JL)x76(JL) 74 + 74	399 652	-	78 74	74 78	9,9,9, II,II,II	9 II
82(KM)x75(KM) 82 + 82	616 478	-	75 82	82 75	II,II,II II,II,II	II II

a = Numéro des porcs
b = Génotype déterminé sérologiquement pour le système SL-A
c = Le rapport représente le nombre de coups par minute de la C.L.M. par rapport à la somme des cultures individuelles des cellules d'un des porcs avec ses propres cellules irradiées.
d = Cellules irradiées à 1200 R
nf= Non fait

CONCLUSION

La réussite des greffes dépend en grande partie du couple Donneur - Receveur choisi.
Ce choix est basé sur la détermination des antigènes d'histocompatibilité, et l'on sait que ceux-ci sont présents en grande quantité sur les petits lymphocytes. Ces derniers présentent le phénomène de transformation blastique dans chaque cas où intervient un processus immunitaire, in vivo et in vitro, notamment dans la culture lymphocytaire mixte. L'étude de cette C.L.M. se justifie alors dans le cadre des recherches sur l'histocompatibilité.

Dans ce sens nous avons étudié la technique de la C.L.M. chez le porc. A partir des résultats déjà obtenus chez d'autres espèces et ceux de nos propres expériences nous avons établi un schéma type de réalisation de cette C.L.M.

Permettant une appréciation globale du degré d'histocompatibilité entre deux ou plusieurs sujets, cette méthode de typage peut être utilisée en parallèle avec les techniques sérologiques dans un but de confirmation des résultats. Elle peut également

servir à suppléer à la sérologie lorsque, par exemple, on ne possède pas de sérums spécifiques.

L'utilisation combinée de ces méthodes de typage devrait permettre d'obtenir des homogreffes persistantes dans l'espèce porcine, en éliminant les antigènes d'histocompatibilité forts, et d'autre part, en obtenant une neutralisation de l'effet des antigènes faibles par l'utilisation d'un sérum anti-lymphocytaire.

Vu :
Le Professeur de l'Ecole vétérinaire
rapporteur,

R. LAUTIE

Vu :
Le Directeur de l'Ecole vétérinaire,

R. FLORIO

Vu :
Le Président de Thèse,

R. RUFFIE

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 18 FEVRIER 1972
Le Président de l'Université Paul-Sabatier,

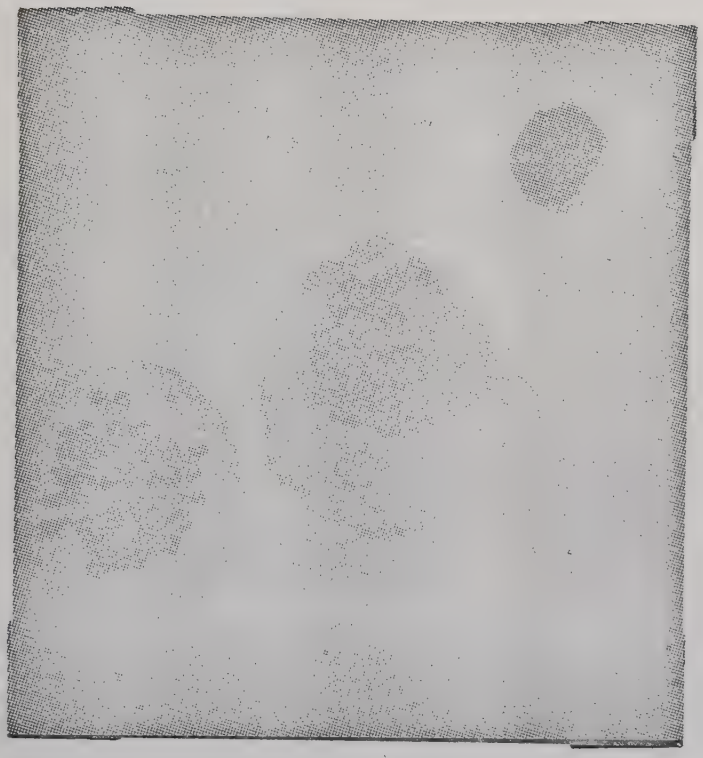
L. LARENG

ANNEXES

A gauche : Petit Lymphocyte "non transformé".
-le noyau occupe la quasi totalité de la cellule

Au centre :Petit Lymphocyte en cours de transformation
-augmentation de la taille de la cellule; le cytoplasme devient bien visible; la chromatine se différencie

A droite : Stade intermédiaire.



A droite : Petit Lymphocyte "non transformé".

Au centre: Petit Lymphocyte en cours de transformation; (cellule semblable au lymphoblaste)

A gauche : Petit Lymphocyte en cours de division; (au stade de la plaque équatoriale).

Composition du milieu de culture

MAC COY 5a.

	g/l.		g/l.
NaCl	6,460	Thiamine,HCl	0,0002
KCl	0,400	Riboflavine	0,0002
MgSO4,7H2O	0,200	Pyridoxine,HCl	0,0005
CaCl2	0,100	Pyridoxal,HCl	0,0005
NaH2PO4,H2O	0,580	Nicotinique Acide	0,0005
D-Glucose	3,000	Nicotinamide	0,0005
NaHCO3	2,200	D-panthoténate,Ca	0,0002
Peptone bactériol.	0,600	Biotine	0,0002
Rouge de Phénol	0,010	Acide folique	0,010
L-tryptophane	0,003	Choline, Cl	0,005
L-phénylalanine	0,017	Inositol	0,036
L-tyrosine	0,018	Ac.p-aminobenzoique	0,001
L-arginine,HCl	0,042	Acide ascorbique	0,0005
L-histidine,HCl,H2O	0,021	Gluthation	0,0005
L-Lysine,HCl	0,037	Vitamine B12	0,002
L-cystéine	0,032		
L-méthionine	0,015		
L-isoleucine	0,039	Pénicilline G	200 UI/ml
L-leucine	0,039	Streptomycine Sulf.	0,050g/l
L-valine	0,018	Néomycine	0,100 -
L-thréonine	0,018		
L-glutamine	0,019		
L-asparagine	0,045		
Glycine	0,008		
L-sérine	0,026		
L-alanine	0,013		
L-proline	0,017		
L-hydroxyproline	0,020		
Acide L-aspartique	0,020		
Acide L-glutamique	0,022		

Composition du P.B.S.

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
$Na_2HPO_4, 12H_2O$	3,63 g
KH_2PO_4	0,2 g
H_2O q.s	1000 ml

BIBLIOGRAPHIE

1 - AMETEAU (J.); Etude de la production d'anticorps antileucocytaires chez le porc. Observations anatomo-cliniques et histologiques des allogreffes cutanées.
Th. Doc. Vét., 1970, Paris.

2 - BACH (F.), HIRSCHHORN (K.); Lymphocyte interaction : a potential histocompatibility test "in vitro".
Science, 1964, 143, 8I3-8I4

3 - BACH (F.), VOYNOW (N.K.); One-way stimulation in Mixed Leukocyte Cultures.
Science, 1966, 153, 1315-1316

4 - BACH (F.), ALBERTINI (R.J.), KLOSTERMANN (H.), DAY (E.); Evaluation of compatibility at the major histocompatibility locus in man. Ds. Curtoni E.S., Mattiuz P.L, Tosi R.H. (eds.) Histocompatibility testing, 1967, 55-65.
Munksgaard, Copenhagen.

5 - BAIN (B.), LOWENSTEIN (L.); Genetics studies on mixed leukocyte reaction.
Science, 1964, 145, 1315-1316.

6 - BAIN (B.), VAS (M.R.), LOWENSTEIN (L.);
The development of large immature monocluears cells in mixed leukocyte cultures.
Blood, 1964, 23, 1, 108-116.

7 - BAIN (B.); Triated-thymidin uptake in mixed leukocyte cultures : Effect of specific activity and exposure time.
Clin. Exper. Immunol. G.B., 1970, 6, 2, 155-62.

8 - CEPPELLINI (R.), FRANCESCHINI (P.), MIGGIANO (V.C.), TRIDENTE (G.);
Directional activation of mixed leukocyte cultures.
Ds. Balner H. Cleton F.J. Eernisse J.G. (eds) Histocompatibility testing, 1965, 225-226, Munksgaard, Copenhagen.

9 - DAUSSET (J.); Groupes leucocytaires et greffes. Journées d'hématologie, 1965, Paris.

10 - DAUSSET (J.), RAPAPORT (F.T.); transplantations d'organes. La base immunologique : les groupes tissulaires.
Atome, 1967, 244, 367.

11 - DAUSSET (J.), LE CALVEZ (H.), SASPORTES (M.), RAPAPORT (F.T.); Immunisation croisée entre frères contre des antigènes leucoplaquettaires du système Hu-1. Nouv. Rev. Fr. Hemat., 1967, 7, 643.

12 - DUBIEZ (R.); Contribution à l'étude de la formule leucocytaire et de la numération globulaire chez le porc. Th. Doct. Vet., 1967, Paris.

13 - GORDON (J.); Role of monocytes in the mixed leukocyte culture reaction. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968, 127, 30-33.

14 - HAAG (J.), NIZZA (P.); Le caryotype du porc normal. Ann. génét., 1969, 12, 4, 242-246.

15 - HALPERN (B.); La place du lymphocyte dans le dispositif immunologique. Ds. Synthèse cellulaire et structure moléculaire des immunoglobulines. 1969, Dunod, Paris.

16 - KASAKURA (S.), LOWENSTEIN (L.); Irradiated and preserved leukocytes in mixed leukocyte cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 125, 355-60.

17 - KASAKURA (S.), LOWENSTEIN (L.); The application of preserved leukocytes in the mixed leukocyte reaction. Leukocyte Culture Conference, 1966, Montréal, Canada.

18 - KOLB (E.); Physiologie des animaux domestiques. 1965, Vigot Frères, Paris.

19 - LING (R.R.); Lymphocyte stimulation. 1968, North-Holland Publishing Company.

20 - MATHE (G.), AMIEL (J.L.), NIEMETZ (J.); Recherche d'un test d'histocompatibilité pour des essais de greffes allogéniques. Etudes chez la souris. Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1961, 6,684.

21 - MATHE (G.), AMIEL (J.L.); La greffe. Aspects biologiques et cliniques. 1962, Masson, Paris.

22 - MATHE (G.); Sélection du meilleur donneur pour les greffes et transplantations allogéniques chez l'homme. Rev. Fr. Et. Clin. Biol.,1966, 11, 565.

23 - MERY (A.M.), BREZIN (C.), SEKIGUCHI (M.) VAUBEL (E.), AMIEL (J.L.), MATHE (G.) Investigation of a test of histo-compatibility for allogenic grafts. A study on men.
Transplantation, 1966, 4, 206.

24 - RUDOLPH (R.H.), HERED (B.), EPSTEIN (R.B.) THOMAS (E.D.); Canine mixed leukocyte reactivity and transplantation antigens.
Transplantation, 1969, 8, 2, 141-146.

25 - TENENBAUM (R.), SEMAN (G.), CHOQUET (C.), LAFUMA (J.); La transformation des cellules souches ganglionnaires et des lymphocytes en cellules hyper-basophiles dans la réaction du greffon contre l'hôte.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol., 1965, 10, 1071.

26 - TERASAKI (P.I), CLELLAND (J.D.); Antibody response to homograft. Relation of mouse hemagglutinins and cytotoxins.
J. Exp. Med., 1963, 117, 675.

27 - TERASAKI (P.I.), VREDEVOE (D.L.), Mc.CLELLAND (J.D.); Serotyping for homotransplantation.
VI- Use of cryogenically stored cells for purification of antisera.
Ds. Balner H. Cleton F.J. Eernisse J.G. (eds) Histocompatibility testing, 1965, 267-270, Munksgaard, Copenhagen.

28 - VAIMAN (M.), RENARD (C.); Technique de préparation de suspensions pures de lymphocytes à partir de sang de porc.
Rev. Europ. Et. Clin. Biol., 1970, 15, 5, 572-575.

29 - VAIMAN (M.), RENARD (C.), LAFAGE (P.), AMETEAU (J.), NIZZA (P.); Evidence for histocompatibility system in swine: SL.A.
Transplantation 1970, 10, 2, 155-164.

30 - VISA (D.), SUGAR (J.R.), BINNS (R.M.); Lymphocyte Stimulation in pigs : Evidence for the existence of single major histocompatibility locus PL-A.
Nature, 1970, 227, 5261, 949-950.

TABLE DES MATIERES

Avant-propos I

Introduction 2

Chapitre I : Matériel et Méthodes

A - La préparation des cultures 11

I- La préparation des cellules 11
a/ Les animaux 12
b/ Le prélèvement 12
c/ Obtention des leucocytes 13
d/ Cellules répondantes et cellules stimulantes 14

II- Les conditions de culture 17
a/ Le milieu de culture 17
b/ Les tubes de culture 19
c/ La phase gazeuse 19
d/ La température d'incubation . 20

III- La mise en culture proprement dite 20
a/ Nombre de tubes 20
b/ Préparation du mélange milieu - cellules 21
c/ Répartition du pool, mise en place de l'atmosphère 21

B- Technique de mesure de l'activité cellulaire de transformation 22

I- Incorporation de thymidine tritiée 24

a/ Préparation de la solution de thymidine tritiée 24

b/ Utilisation de la thymidine tritiée 24

II- Notions sur la scintillation liquide 25

III- Préparation des échantillons pour le comptage en scintillation liquide 27

Chapitre II : Résultats expérimentaux

A - La préparation des cultures 30

I- La préparation des cellules 31

II- Les conditions de culture 39

a/ Le milieu 39

b/ Les tubes de culture 43

c/ La phase gazeuse et la quantité de milieu 45

d/ Le temps de culture 45

e/ Concentration cellulaire dans le milieu de culture 49

B - Technique de mesure de l'activité cellulaire de transformation 52

C - Schéma résumé des conditions de culture 53

Chapitre III : Discussion 55

Conclusion 67

Annexes 69

Bibliographie 74